PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **61-132869**
(43)Date of publication of application : **20.06.1986**

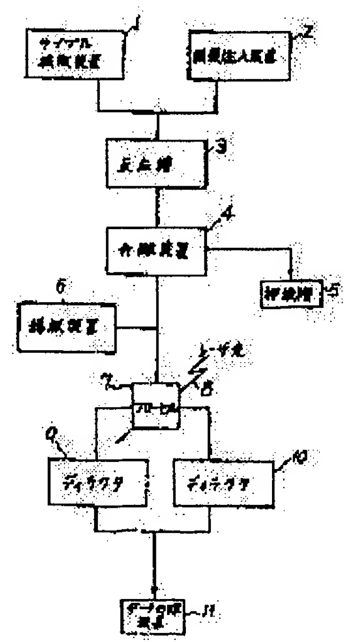
(51)Int.Cl. G01N 33/543
A61K 39/00

(21)Application number : **59-255206**
(22)Date of filing : **03.12.1984**

(71)Applicant : **OLYMPUS OPTICAL CO LTD**
(72)Inventor : **KARAKI SACHIKO**
KANO TOKIO
TAMAGAWA AKIRA
NAKAMURA MAKOTO
KUMAZAWA TOSHIAKI

(54) IMMUNOLOGICAL ANALYSIS

(57)Abstract:



PURPOSE: To easily execute a desired analysis by bringing a labeling antigen (antibody) and antigen (antibody) in a sample into reaction then separating the same to the immune complex and the remaining antigen (antibody) (B-F sepn.) and measuring the same with a flow sight meter.

CONSTITUTION: A latex soln. conjugated with a solid phase antibody, sample and labeling antibody soln. are added by a sample drawing device 1 and a reagent injector 2 into a reaction vessel 3 contg. a buffer soln. for reaction and the reactive liquid from the cell 3 is subjected to the B-F sepn. in a separator 4. The immune complex remaining by failing to pass through the separator 4 is diluted by the buffer soln. of a

diluting device 6. The soln. is introduced into a flow cell 7 and light 8 is irradiated on the soln. The size of the immune complex and the fluorescence quantity /1 latex riding thereon are measured by a data processing unit 11 and the sight gram is obtd. from these two parameters. The analytical result having the high quantitative determination characteristic is thus obtd. simply by introducing the sample into the flow system.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑲日本国特許庁（JP）　⑪特許出願公開
⑫公開特許公報（A）　昭61－132869

⑤Int.Cl.⁴　識別記号　庁内整理番号　㊸公開　昭和61年(1986) 6月20日
G 01 N 33/543　7906－2G
A 61 K 39/00　8214－4C
審査請求　未請求　発明の数 1　（全6頁）

㉞発明の名称　免疫学的分析方法

㉑特　願　昭59－255206
㉒出　願　昭59(1984)12月3日

⑫発明者　唐木　幸子　東京都渋谷区幡ケ谷2丁目43番2号　オリンパス光学工業株式会社内
⑫発明者　嘉納　時男　東京都渋谷区幡ケ谷2丁目43番2号　オリンパス光学工業株式会社内
⑫発明者　玉川　彰　東京都渋谷区幡ケ谷2丁目43番2号　オリンパス光学工業株式会社内
⑪出願人　オリンパス光学工業株式会社　東京都渋谷区幡ケ谷2丁目43番2号
⑭代理人　弁理士　杉村　暁秀　外1名

最終頁に続く

明　細　書

1.発明の名称　免疫学的分析方法

2.特許請求の範囲

1. サンプルと、抗原または抗体を所定の物質で標識した標識抗原または抗体と、抗原または抗体を固相化した担体とを反応させた後、その反応液中の前記担体に結合した標識抗原または抗体と、結合しないそれとを分離してから、前記担体に結合した標識抗原または抗体をフローサイトメータにより測定して前記サンプル中の所定の物質を分析することを特徴とする免疫学的分析方法。

3.発明の詳細な説明

（技術分野）

本発明は免疫学的分析方法に関するものである。

（従来技術）

血液、体液等に含まれるグロブリン、酵素等の蛋白質、ホルモン、細菌、ウィルス等はその分子構造が類似していたり、ごく微量であるために、通常の分析方法では同定、定量が困難である。そこで、これらの物質の分析には、一般に抗原抗体反応を利用した免疫学的な分析方法が用いられている。

このような免疫学的分析方法には、例えば標識物質を用いるものとして、RIA(ラジオイムノアッセイ）、EIA(エンザイムイムノアッセイ）、FIA(フルオロイムノアッセイ）等がある。また、これらの標識物質を用いる分析方法は、測定系において、例えば標識物質で標識した抗体（抗原）とサンプル中の抗原（抗体）とが抗原抗体反応を起こした免疫複合体（Bound）と、抗原抗体反応に関与せず、自由（Free）な状態で残余する標識抗体（抗原）と分離する操作いわゆるB-F分離を必要とするヘテロジニアス法と、必要としないホモジニアス法とに分類される。

上記のヘテロジニアス法による分析方法としては、特開昭53-10495号公報において、カラムクロマトグラフィーを利用してB-F分離を行なうようにしたものが提案されている。これは、例えば溶液中の遊離物質（Free）を選択的に吸着し、免疫

複合体（Bound ）を吸着しないイオン交換樹脂や、分子ふるい効果を有するゲルクロマトグラフィー用の充塡剤を吸着剤として用いてB-F 分離を行なうというものである。

しかし、このようにB-F 分離をカラムクロマトグラフィーを用いて行なうものにおいては、免疫複合体の大きさや形状にばらつきがあったり、免疫複合体と遊離物質との大きさが近接しているとB-F 分離が困難となり、精度が悪くなる。このため、例えば免疫グロブリン等の試薬として用いる抗体と同じ分子や、化学的、物理的に類似した分子の測定には使用できず、分析項目が極めて制限される。

（発明の目的）

本発明の目的は、上述した不具合を解決し、B-F 分離を常に確実に行なうことができ、所望の分析を容易にかつ高精度にできる免疫学的分析方法を提供しようとするものである。

（発明の概要）

本発明の免疫学的分析方法は、サンプルと、抗原または抗体を所定の物質で標識した標識抗原または抗体と、抗原または抗体を固相化した担体とを反応させた後、その反応液中の前記担体に結合した標識抗原または抗体と、結合しないそれとを分離してから、前記担体に結合した標識抗原または抗体をフローサイトメータにより測定して前記サンプル中の所定の物質を分析することを特徴とするものである。

（実施例）

第1図は本発明方法を実施するフローシステムの一例を示すものである。

本例では、抗原を含んだサンプルをサンプル採取装置1で採取し、試薬（担体および標識抗体）を試薬注入装置2より注入した後、反応槽3で抗原抗体反応を起こさせる。その後、反応液を分離装置4に通して抗原抗体反応に関与しなかった残余の標識抗体（Free）を排液槽5に排出してB-F 分離した後、稀釈装置6で担体を含む免疫複合体（Bound ）を緩衝液等で稀釈してフローサイトメータのフローセル7に流す。ここで、レーザ光8の照射により生じた散乱光と螢光を各ディテクタ9および10により検出し、その出力をデータ処理装置11で処理してサンプル中の所定の抗原を分析する。

第2図は、本発明の分析方法における反応模式図の一例を示すものである。本例において、符号21は担体に用いるラテックスで、例えば5 μの均一な径のポリスチレン製のものに物理的吸着により、固相抗体22が固相化されている。符号23はサンプルである血清等に含まれている分析対象となる抗原で、符号24は抗原23に特異的に結合する抗体をFITC等の螢光物質で標識した標識抗体である。また、符号25は抗原抗体反応後の免疫複合体(Bound)であり、符号26は残余の標識抗体（Free）である。

以下、第1図に示すフローシステムにおける作用をヒト IgEの分析を例にとって説明する。この場合、第2図に示すラテックス21には抗ヒトIgE モノクロナル抗体22を吸着させる。モノクロナル抗体の使用は、より特異的に抗原と結合させる目的による。また、サンプルとしての抗原は、ヒトIgE 23とし、標識抗体24にはFITC標識抗ヒトIgE抗体を用いる。なお、標識抗体24は非特異吸着を少なく、また反応速度を高める目的でFab フラグメントを用いるのが望ましい。反応は、反応用緩衝液200 μℓを収容する反応槽3に、固相抗体結合ラテックス溶液50μℓと、サンプル10μℓと、標識抗体溶液50μℓとをサンプル採取装置1及び試薬注入装置2により添加して行なわせる。なお、これらの試薬類は、全て同時に添加しても、また抗原を固相抗体と反応させて後、標識抗体と反応させるように逐次添加しても良い。

ここで、例えば37℃、10分間反応させると、固相抗体－抗原－標識抗体の免疫複合体25と残余の標識抗体26とが生成される。

その後、反応槽3から 300μℓの反応液を吸引し、これを分離装置4において例えば第3図に示す多孔質セラミック筒31に通して B-F分離する。多孔質セラミックは孔の径が均一に出来ており、例えばその孔径を1μとすると、反応液中の抗ヒトIgE MCA 固相ラテックスー抗原IgE －FITC標識

抗ヒトIgE Fab フラグメントの免疫複合体25および抗原抗体反応に関与しなかった残余の固相抗体ラテックスは、ラテックスの大きさだけで5 μあるので多孔質セラミックを通過しない。

これに対し、残余の標識抗体26はその大きさがせいぜい数10nmであるため、多孔質セラミックを通過し、これにより濾過の原理で B-F分離が行なわれる。

こうして、多孔質セラミック筒31を通過できずに残った免疫複合体は、稀釈装置6から緩衝液を数回流して洗浄した後、一定量の緩衝液で稀釈して第4図に示すフローサイトメータに流して測定する。

フローサイトメータは既に知られているように、細胞の分析専用機であり、フローセル7中のニードル35に反応後、B-F分離を行なった溶液36を流し、レーザ光8をその流れに照射して細胞から発する散乱光や蛍光を測定する。通常、前方散乱光はレーザ入射光とほぼ水平に位置するディテクタ9で検知され、主に細胞サイズの測定に用いられている。蛍光は、レーザ光8の入射角に対して垂直方向に位置するディテクタ10で検知され、細胞表面の蛍光物質等の測定に用いられる。レーザ光8は単一波長であるため使用できる蛍光色素に制限があるが、本例の分析方法において用いる蛍光色素FITCは波長 489nm近くの光を吸収して波長 515nmの蛍光を発するので、この場合は波長 488 nmのArレーザを用いれば良い。

このようにして、フローサイトメータに通すと、ディテクタ9,10の出力に基いてデータ処理装置11において免疫複合体の大きさと、その上に乗った蛍光量／1ラテックスとが測定され、これら2つのパラメータによって第5図に示すサイトグラムが得られる。なお、第5図において縦軸は蛍光量を、横軸は粒子径を表わす。ここで、抗原抗体反応に関与しなかったラテックスは、蛍光を発しないのでサイトグラム中に表現されないが、免疫複合体を形成したラテックスは、その径のところに蛍光量に応じて示される。このようにして、蛍光量測定値が得られれば、予じめIgE 抗原標品の既知濃度系列から同様にして求めた蛍光強度の検量線に基いてサンプル中のIgE 濃度を求めることができる。このようにして、上述のフローシステムにサンプルを導入するだけで、簡便な反応系によりB-F 分離、測定と一連の処理を短時間（フローサイトメータは約5000粒子／sec で測定できる）で行なうことができ、しかも定量性の高い分析結果を得ることができる。

本発明の他の実施例においては、数種類の粒径の異なるラテックス粒子に、それぞれの粒径ごとに異なる抗原を結合させた混合担体を用い、この混合担体と、種々の抗原を含んだサンプルと、それぞれの抗原に対する特異抗体に蛍光標識した各標識抗体とを加えて反応させた後、上記実施例と同様の原理で B-F分離してから、フローサイトメータにより、免疫複合体のラテックス粒子径別の蛍光強度を求める。このようにすれば、第6図に示すようなサイトグラムが得られるから、その各々の蛍光強度から複数の抗原濃度を同時に分析することができる。

また、本発明の更に他の実施例においては、第7図に示すように、フローチューブ41の一部に電磁石42を設け、またサンプルを反応させる担体として鉄芯入りの磁性ラテックスを用いる。このようにして、反応後のサンプルを微速でフローチューブ41内を流す際に電磁石42に通電することにより、磁性ラテックスを吸引して免疫複合体43をフローチューブ41の内側面に付着させ、残余の標識抗体44を通過させる。その後、稀釈用緩衝液を流して洗浄してから、電磁石42をオフにして一定量の緩衝液で稀釈する。このようにしても、上述した実施例と同様、 B-F分離をフローシステム中で確実に行なうことができる。

なお、上述した実施例では、担体としてラテックスを用いたがラテックスに限らず分子量の均一な人工細胞等、測定対象に応じて任意の形状や大きさのものを用いることができる。また、本発明は競合法による分析にも有効に適用することができる。更に、本発明においては、担体を用いるものであるから、 B-F分離を上述したカラムクロマ

トグラフィーを用いて行なうこともできる。

（発明の効果）

以上述べたように、本発明によれば、抗体固相担体を用いるから、その免疫複合体と残余の標識抗体との大きさが大きく異なり、したがってフローシステム中で B-F分離を簡単かつ確実に行なうことができる。また、B-F分離後にフローサイトメータにより測定するものであるから、高精度の分析結果を得ることができる。更に、担体は任意の大きさのものを選ぶことができ、したがって分析項目が限定されないと共に、複数の粒子径を用いることにより同時に多項目の分析を行なうこともできる。また、フローシステムにより煩雑な B-F分離を簡略化しており、高速度、多検体測定を目的とした自動化が可能である。

4.図面の簡単な説明

第1図は本発明方法を実施するフローシステムの一例を示す図、

第2図は本発明方法における一例の反応模式図、

第3図は B-F分離の一例を説明するための図、

第4図はフローサイトメータを説明するための図、

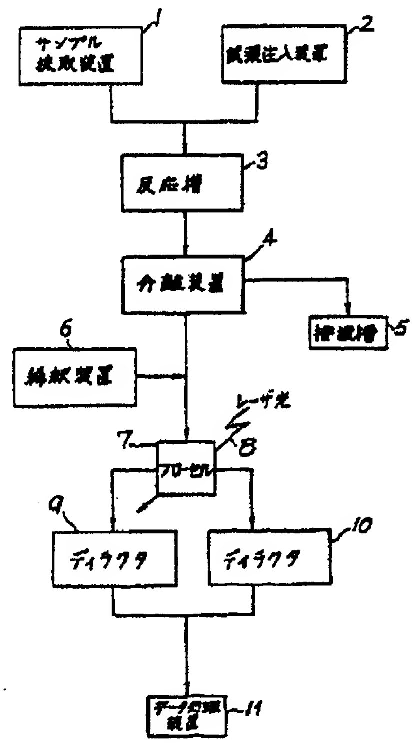
第5図はサイトグラムの一例を示す図、

第6図は同じく他の例を示す図、

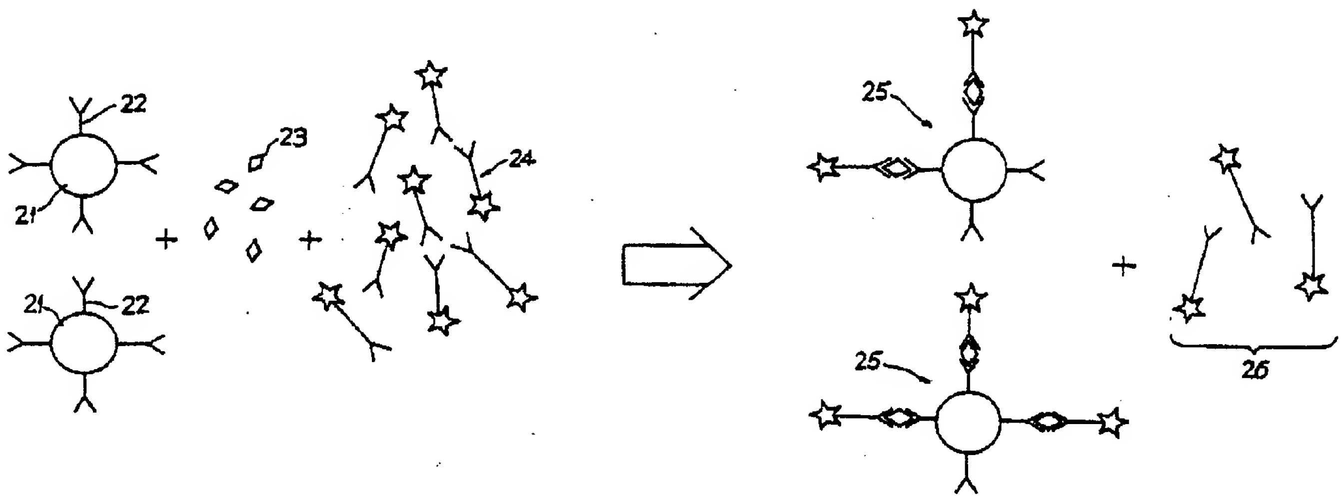
第7図は B-F分離の他の例を説明するための図である。

1…サンプル採取装置
2…試薬注入装置　3…反応槽
4…分離装置　5…排液槽
6…稀釈装置　7…フローセル
8…レーザ光　9,10…ディテクタ
11…データ処理装置　21…ラテックス
22…固相抗体　23…抗原
24…標識抗体　25…免疫複合体
26…残余の標識抗体
31…多孔質セラミック筒
35…ニードル　41…フローチューブ
42…電磁石　43…免疫複合体
44…残余の標識抗体

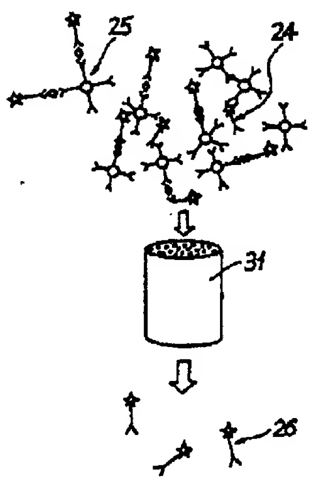
第1図



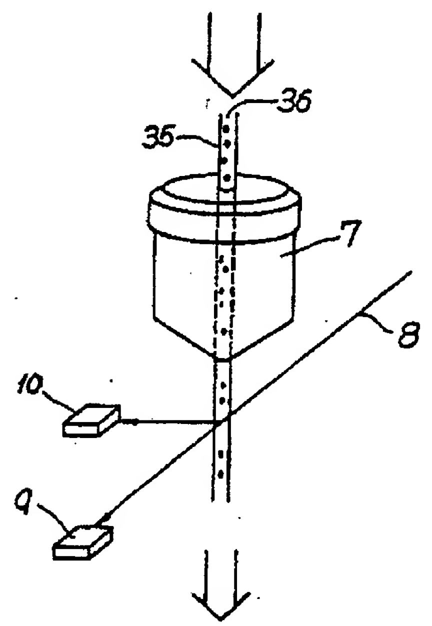
第 2 図



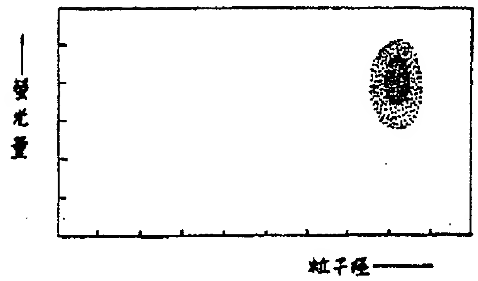
第 3 図



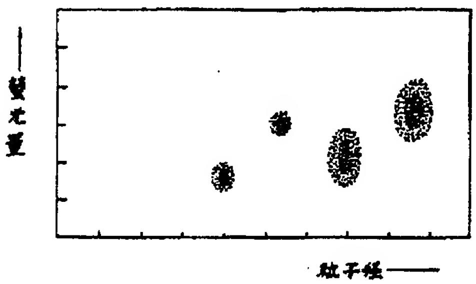
第 4 図



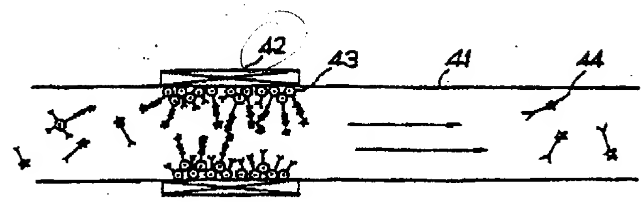
第5図



第6図



第7図



第1頁の続き
⑫発 明 者　中　村　　　誠　東京都渋谷区幡ケ谷2丁目43番2号　オリンパス光学工業株式会社内
⑫発 明 者　熊　沢　　俊　明　東京都渋谷区幡ケ谷2丁目43番2号　オリンパス光学工業株式会社内

Translation from the Japanese

JAPANESE PATENT OFFICE

Official Gazette for Unexamined Patent Applications

Unexamined Patent Application (Kokai) No. 61-132869

(43) Disclosure Date: 20 June 1986

(51) Int.Cl.^{4} | Internal Office Nos.

G 01 N 33/543	7906-2G
A 61 K 39/00	8214-4C

Request for Examination: Not yet requested

Number of Claims: 1

A METHOD OF IMMUNOLOGICAL ANALYSIS

(21) Application No.: 59-255206

(22) Application Date: 3 December 1984

(72) Inventors: Sachiko Karaki
c/o Olympus Optical Company, Ltd.
43-2 Hatagaya 2-chome, Shibuya-ku, Tokyo-to

Tokio Kano
c/o Olympus Optical Company, Ltd.
43-2 Hatagaya 2-chome, Shibuya-ku, Tokyo-to

Akira Tamagawa
c/o Olympus Optical Company, Ltd.
43-2 Hatagaya 2-chome, Shibuya-ku, Tokyo-to

Makoto Nakamura
c/o Olympus Optical Company, Ltd.
43-2 Hatagaya 2-chome, Shibuya-ku, Tokyo-to

Toshiaki Kumazawa
Olympus Optical Company, Ltd.
43-2 Hatagaya 2-chome, Shibuya-ku, Tokyo-to

(71) Applicant: Olympus Optical Company, Ltd.
43-2 Hatagaya 2-chome, Shibuya-ku, Tokyo-to

(74) Agent: Akihide Sugimura, Patent Attorney, And 1 Other

Specification

1. A METHOD OF IMMUNOLOGICAL ANALYSIS

2. Claim

1. A method of immunological analysis characterized in that a sample, labeled antigens or antibodies obtained by labeling antigens or antibodies with a specified substance and a carrier in which antibodies or antigens have been converted to solid phase are reacted, after which the labeled antigens or antibodies, which are bonded with the aforementioned carrier in the reaction solution and those that are not bonded are separated, after which the labeled antigens or antibodies that are bonded to the aforementioned carrier are determined with a flow cytometer and the specified substance in the sample is analyzed.

3. Detailed Description of the Invention

(Technological Field)

This invention relates to a method of immunological analysis.

(Prior Art)

Because the molecular structures of proteins such as globulin, enzymes, hormones, bacteria and viruses that are present in blood and body fluids are similar and because they are present in minute quantities, it is difficult to identify and make quantitative determinations of them by ordinary analytic methods. For this reason, immunological analytic methods making use of antigen-antibody reaction are generally used in the analysis of these substances.

These immunological methods, in which labeled substances are used, include, for example, RIA (radioimmunoassay), EIA (enzyme immunoassay) and FIA (fluoro-immunoassay). These methods in which labeling substances are used are classified into heterogeneous methods in which so-called B-F separation of procedures is necessary in the determination system whereby, for example, the antibodies (antigens) that are labeled by the labeling substances and the antigens (antibodies) in the samples are separated into immune complexes (bound) in which antigen-antibody reactions are brought about and labeled antibody (antigen) that does not participate in antigen-antibody reactions and that remain in a free state and into homogeneous methods in which this is not necessary.

An analytic method based on the heterogeneous method described above in which B-F separation is performed by column chromatography is described in Japanese Patent Application Early Disclosure No. 53-10495 [1978]. In this method, B-F separation is performed using an ion exchange resin that selectively adsorbs the free substance in the solution and that does not adsorb the immune complex (bound), and, as the adsorbent, a filler for gel chromatography having a molecular sieve effect.

However, in performing B-F separation in this way using column chromatography, there are variations in the size and shape of the immune complex, B-F separation of immune complexes and free substance that are close to each other in size is difficult and precision is poor. For this reason, for example, this method cannot be used in the determination of molecules such as immune globulins that are the same as the antibodies that are used as reagents and of chemically and physically similar molecules so that the items that can be analyzed are extremely limited.

(Objective of the Invention)

The objective of this invention is to provide an immunological analytic method whereby the problems discussed above are resolved and whereby B-F separation can always be performed reliably and the desired analysis can be effected easily and with high precision.

(Synopsis of the Invention)

The immunological analytic method of this invention is characterized in that a sample, labeled antigens or antibodies obtained by labeling antigens or antibodies with a specified substance and a carrier in which antibodies or antigens have been converted to solid phase are reacted, after which the labeled antigens or antibodies, which are bonded with the aforementioned carrier in the reaction solution and those that are not bonded are separated, after which the labeled antigens or antibodies that are bonded to the aforementioned carrier are determined with a flow cytometer and the specified substance in the sample is analyzed.

(Working Examples)

Figure 1 shows an example of the flow system whereby the method of this invention is executed.

In this example, a sample containing antigens is collected by the collection device 1 and the reagents (antibodies and labeled antibodies) are injected from the reagent injection device 2, after which an antigen-antibody reaction is carried out in the reaction tank 3. Following that, the reaction solution is passed into the reaction apparatus 4 and the remaining labeled antibody (free) that did not take part in the antigen-antibody reaction is discharged into the solution discharge tank 5 in which B-F separation is effected, after which the immune complex (bound) that contains the antibodies is diluted with a buffer solution in the dilution apparatus 6 and then flows into the flow cell 7 of the

flow cytometer. Here, the scattered light that is produced by irradiation of the laser light 8 and fluorescent light are detected by the detectors 9 and 10, the output is processed by the data processing apparatus 11 and the specified antigen in the sample is analyzed.

Figure 2 shows an example of the reaction diagram in the analytic method of this invention. In this example, latex, which is indicated by the symbol 21 and which is used for the carrier is physically adsorbed, for example, to a structure made of polystyrene of a uniform diameter of 5 and the solid phase antibody 22 is converted to solid state. The symbol 23 represents the antigen that is contained in the serum, which is the sample, and which is the object of analysis, and the symbol 24 represents a labeled antibody that was obtained by labeling an antibody that is specifically bound to the antigen 23 with a fluorescent substance such as FITC. In addition, the symbol 25 represents the immune complex (bound) after the antigen-antibody reaction and the symbol 26 the remaining labeled antibody (free).

We shall now describe the action in the flow system shown in Figure 1 taking analysis of human IgE as the example. In this example, the anti-human IgE monoclonal antibody 22 is adsorbed to the latex 21 shown in Figure 2. The use of the monoclonal antibodies is, more specifically, for binding with the antigens. The antigens used as the sample are the human IgE 23. FITC labeled anti-human IgE antibodies are used as the labeled antibodies 24. It is desirable to use Fab fragments as the labeled antibodies 24 for the purposes of diminishing nonspecific adsorption and of increasing the reaction rate. The reaction is performed by adding 50 μl of a solution of latex to which solid phase antibody is bound, 10 μl of sample and 50 μl of labeled antibody solution to the reaction tank 3, which accommodates 200 μl of buffer solution. These reagents may all be added at the same time, the antigens may be added after the reaction with the solid phase antibodies or they may be added successively so as to react with the labeled antibodies.

When the reaction is performed, for example, at 37°C for 10 minutes, the immune complex 25 comprised of solid phase antibodies-antigens-labeled antibodies and the remaining labeled antibodies 26 are produced.

Following this, 300 μl of reaction solution is suctioned from the reaction tank 3 and is then passed into the separation apparatus 4, for example, the porous ceramic tube 31 shown in Figure 3, in which B-F separation is performed. The diameters of the pores of the porous ceramic material are uniform. For example, when the pore diameters are made to 1 μm, the immune complex 25 of anti-human IgE MCA solid phase latex and antigen IgE-FITC labeled anti-human IgE Fab fragments and the remaining solid phase antibody latex that did not take part in the antigen-antibody reaction do not pass through the porous ceramic material because the size of the latex is 5 μm.

By contrast, because the size of the remaining labeled antibodies 26 is at the most several tens of nm, they can pass through the ceramic material with the result that B-F separation is performed by the principles of filtration.

The remaining immune complex that could not pass through the porous ceramic tube 31 is washed by pouring buffer solution from the buffer solution tank 6 through it several times, after which it is diluted with a fixed quantity of buffer solution poured into the flow cytometer shown in Figure 4, with determinations then being made.

The flow cytometer, as indicated previously, is a dedicated analytic device for cells. The solution 36 that has undergone B-F separation is poured into needle 35 of the flow cell 7 after the reaction, the flow is irradiated by the laser light 8 and determinations are made of the scattered light and fluorescent light that emanate from the cells. Ordinarily, the scattered light in front is detected by the detector 9, which is positioned essentially parallel to the incident laser light. It is used primarily for determination of cell size. The fluorescent light is detected by the detector 10, which is positioned in the direction perpendicular to the angle of incidence of the laser light 8. It is used for the determination of fluorescent substances on cell surfaces. Because the laser light 8 is of a single wavelength, there are limitations on the fluorescent pigments that can be used. The fluorescent pigment FITC that is used in the analytic method in this example absorbs light in the vicinity of a wavelength of 489 nm and emits fluorescent light at a wavelength of 488 nm. Therefore, in this case, it is desirable to use an Ar laser of a wavelength of 488 nm.

Thus, when the sample passes through the flow cytometer, the size of the immune complex and the quantity of fluorescent light/1 latex are determined in the data processing unit 11 on the basis of the outputs of the detectors 9 and 10 and the cytogram shown in Figure 5 is obtained from these two parameters. In figure 5, the vertical axis shows the quantity of fluorescent light and the horizontal axis shows the diameters of the particles. Here, the latex that did not take part in the antigen-antibody reaction did not emit fluorescence and therefore is not represented in the cytogram. However, the latex that formed the immune complex is indicated in correspondence to the quantity of fluorescent light at its diameter. Thus, when the determined value for the quantity of fluorescent light is obtained, the IgE concentration in the sample can be found on the basis of the measurement of the fluorescence intensity found in the same way in advance from a known concentration series of IgE antigen specimens. In this way, by simply introducing a sample into the flow system described above, the series of processes of B-F separation and determination can be performed by means of a simple reaction system in a short time (determination being possible with a flow cytometer at approximately 5000 particles/second). Moreover, highly quantitative analytic results can be obtained.

In another embodiment of this invention, mixed carriers in which antigens of respectively different particle diameters are bound to multiple latex particles of different particle sizes are used. The mixed carrier, the sample containing various antigens and various labeled antibodies that are specific antibodies to the respective antigens and that been labeled with fluorescent agent are added and a reaction is carried out, after which B-F separation is performed by the same principal as in the example described above, the fluorescence intensities of the immune complexes with respect to different latex particle sizes then being found by flow cytometry. Because the cytogram shown in Figure 6 was

obtained in this way, multiple antigen concentrations can be analyzed at the same time from the various fluorescence intensities.

In a further embodiment of this invention, the electromagnet 42 is installed in a part of the flow tube 41 as shown in Figure 7 and magnetic latex particles having iron cores are used as the carriers to be reacted with the samples. Thus, when the sample flows through the flow tube at a slow speed after the reaction, the magnetic latex is suctioned by passing electric current into the electromagnet 42, the immune complex 43 is attached to the inside surface of the flow tube 41 and the remaining labeled antibody 44 is passed through the tube. Following this, it is washed by pouring through dilution buffer solution, after which the electromagnet 42 is turned off and dilution is effected with a fixed quantity of buffer solution. In this way, as in the example described above, B-F separation can be performed reliably in the flow system.

In the embodiment described above, latex was used as the carrier. However, the carrier is not limited to latex and materials such as artificial cells of uniform molecular weight can be used in any desired shape or size depending on the object of determination. This invention can be applied effectively in analysis by competitive methods. Moreover, because there is a substance that is used as a carrier in this invention, B-F separation can be carried out using column chromatography as described above.

(Effect of the Invention)

As described above, because, by means of this invention, an antibody solid phase carrier is used, there is a great difference between the sizes of the immune complex and the remaining labeled antibodies. Consequently, B-F separation in the flow system is simple and can be performed reliably. Further, because the determinations are made with a flow cytometer after B-F separation, analytic results of high precision can be obtained. In addition, a carrier of any desired size can be selected. Consequently, there is no limitation on the items for analysis and analysis of many items can be performed at the same time by using multiple particle diameters. Further, B-F separation by flow systems, which is troublesome, is simplified and automation for high-speed determination of many samples is possible.

4. Brief Explanation of the Figures

Figure 1 shows an example of a flow system for execution of the method this invention.

Figure 2 is a reaction diagram of an example in the method of this invention.

Figure 3 is a diagram for illustrating an example of B-F separation.

Figure 4 is a diagram for illustrating the flow cytometer.

Figure 5 shows an example of a cytogram.

Figure 1

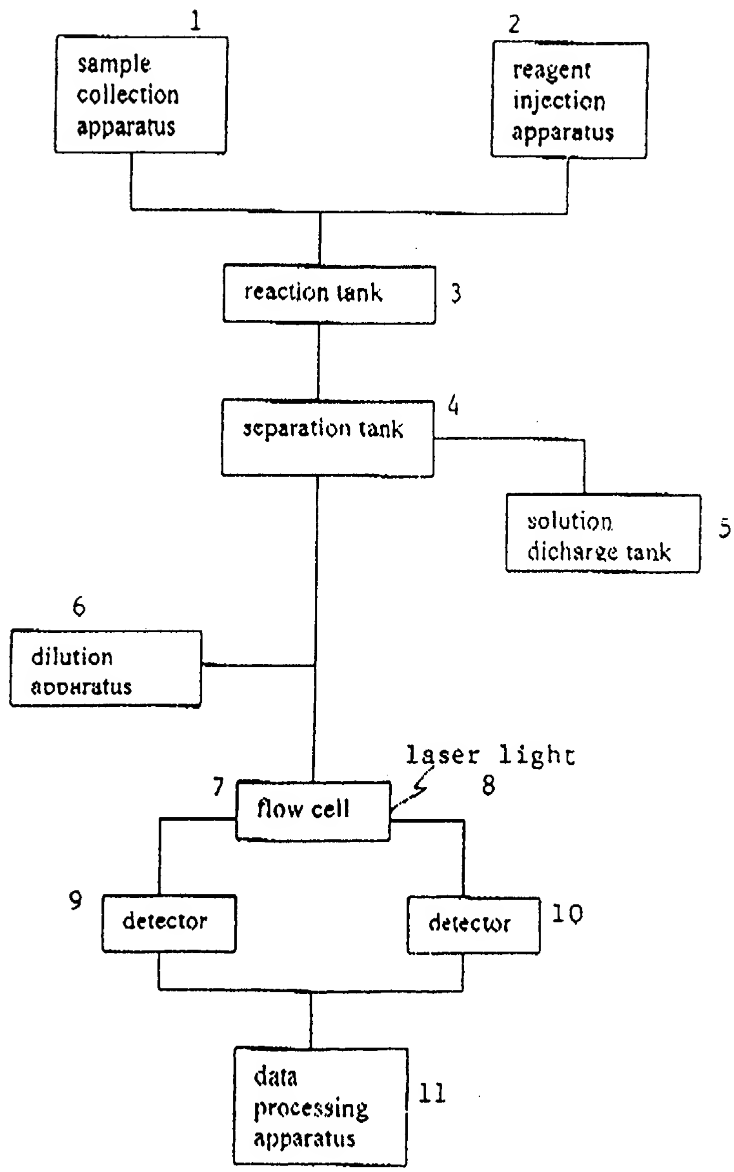

1
sample collection apparatus
2
reagent injection apparatus
reaction tank
3
separation tank
4
solution dicharge tank
5
6
dilution apparatus
laser light
7
flow cell
8
9
detector
detector
10
data processing apparatus
11

Figure 2

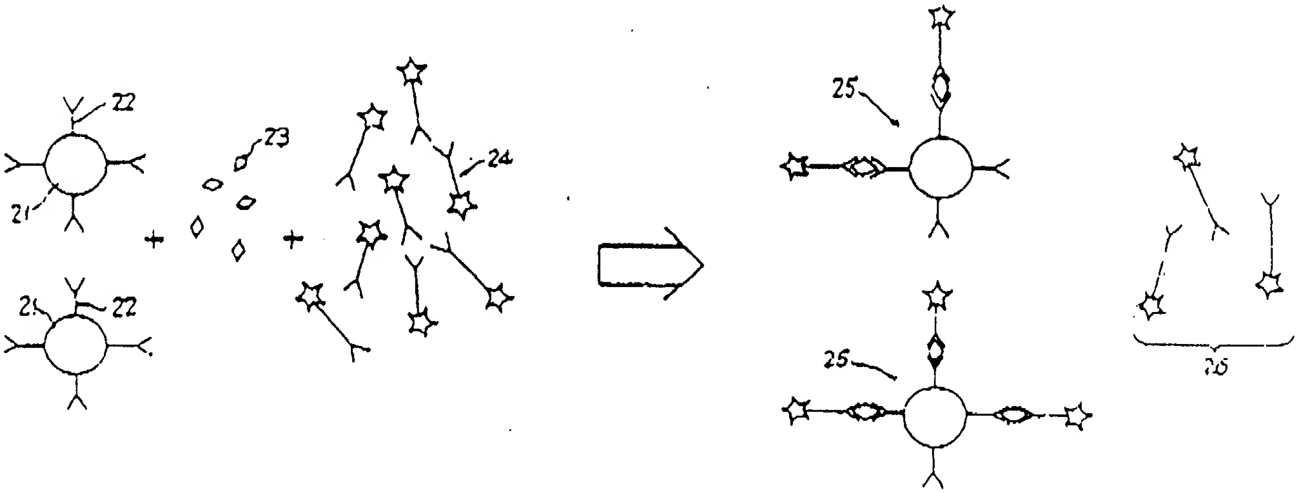
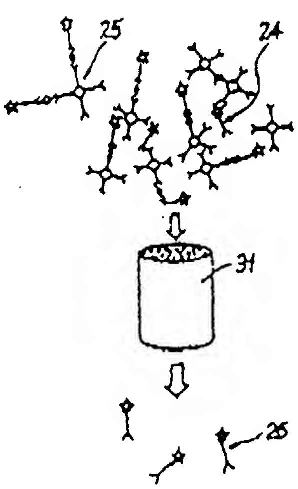


Figure 4

Figure 3



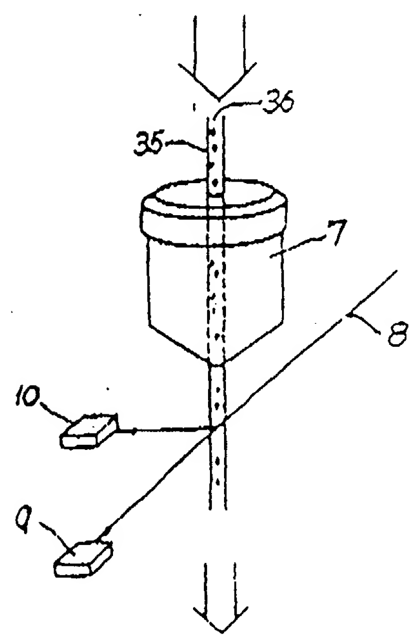


Figure 6 is a figure that shows another example of a cytogram.

Figure 7 is a figure for illustrating another example of B-F separation.

1 - sample collection apparatus

2 - reagent injection apparatus | 3 - reaction tank

4 - separation apparatus | 5 - fluid discharge tank

6 - dilution apparatus | 7 - flow cell

8 - laser light | 9, 10 - detectors

11 - data processing apparatus | 21 - latex

22 - solid phase antibodies | 23 - antigens

24 - labeled antibodies | 25 - immune complex

26 - remaining labeled antibodies

31 - porous ceramic tube

35 - needle | 41 - flow tube

42 - electromagnet | 43 - immune complex

44 - remaining labeled antibody

Figure 7

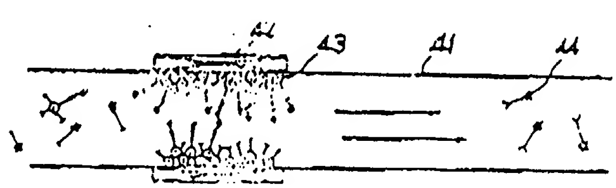


Figure 5

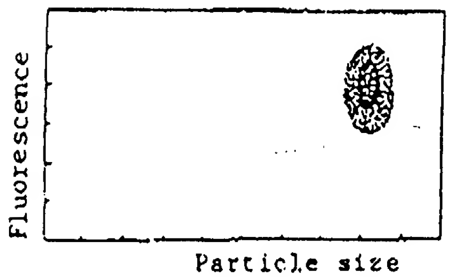


Figure 6